

養成技術者の研究・研修成果等

1．養成技術者氏名：広岡 和丈

2．養成カリキュラム名：植物利用エネルギー使用合理化工業原料生産技術研究開発

3．養成カリキュラムの達成状況

本カリキュラムにおいては、高分子トランス型ゴム生産植物であるトチュウ、高分子シス型ゴム生産植物であるパラゴムノキ、そしてモデル植物であるシロイヌナズナを研究材料にして生化学的および分子生物学的手法を用いて、植物におけるイソプレンポリマー生合成機構の解明を目指して研究を遂行した。当初、トチュウおよびパラゴムノキから、高分子ゴム生合成に關与するタンパク質複合体の精製、単離を試みたが、ゴム合成活性を有する複合体の単離、特性解析には至らなかった。これは精製の段階で複合体が解離するためであると考えられた。そこで次に、配列相同性を利用してイソプレン鎖伸長反応を触媒すると予想されるタンパク質をコードする遺伝子をパラゴムノキおよびシロイヌナズナから単離し、それらの遺伝子を大腸菌で発現させ、得られた組換えタンパク質の特性解析を行った。パラゴムノキから単離した遺伝子がコードするタンパク質についてはその機能を明らかにすることはできなかったが、シロイヌナズナから単離した2種類の新規遺伝子については、植物由来の従来知られていた酵素よりも長い鎖長の生成物を与える酵素をコードすることを証明できた。また、これらの酵素が植物細胞内において別々のオルガネラに存在することを示すデータを得ることもできた。以上の成果により、イソプレンポリマー生合成機構の完全解明には至らなかったが、その解明につながるある程度の進展はあったものと考えている。

4．成果（A4版3枚程度）

植物が生産するゴム成分は、2重結合がトランス型のものとシス型のものとの2種類の幾何異性体が存在し、両者の物性は大きく異なる。これらのゴム成分は、アリル性基質とイソペンテニルニリン酸（IPP）との縮合反応より生じるトランス型およびシス型長鎖プレニルニリン酸（炭素数数千 - 数万）にそれぞれ由来すると考えられているが、それらを合成する酵素についての知見は乏しい。そこで植物におけるゴム生産強化を目指し、植物でのゴム生合成機構を解明するための研究を遂行した。研究材料としては、高分子トランス型ゴム生産植物であるトチュウ（*Eucommia ulmoides*）、高分子シス型ゴム生産植物であるパラゴムノキ（*Hevea brasiliensis*）、そしてモデル植物であるシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）を使用し、以下に示す3つの生化学的および分子生物学的手法を用いた研究を行なった。

1. トチュウおよびパラゴムノキからの高分子ゴム合成活性を有するタンパク質複合体の精製および特性解析
2. パラゴムノキからのイソプレン鎖伸長反応を触媒する酵素のクローニングおよび特性解析
3. シロイヌナズナからのイソプレン鎖伸長反応を触媒する酵素のクローニングおよび特性解析

1. トチュウおよびパラゴムノキからの高分子ゴム合成活性を有するタンパク質複合体の精製および特性解析

トランス型およびシス型ゴム成分は、アリル性基質と IPP との縮合反応より生じるトランス型およびシス型長鎖プレニルニリン酸（炭素数数千 - 数万）にそれぞれ由来すると考えられている。これらのイソプレノポリマー合成活性について特性解析を行うために、トランス型ゴム生産植物であるトチュウの葉およびシス型ゴム生産植物であるパラゴムノキの樹液から、それぞれトランス型およびシス型長鎖プレニルニリン酸合成酵素活性を精製することを試みた。

トチュウの葉を緩衝液中で破碎してその後、陰イオン交換樹脂を用いて色素成分を除去し、粗酵素抽出液を調製した。これを硫酸分画して透析後の粗酵素溶液を用いて、アリル性基質と[4-¹⁴C]IPPを反応させ、TLC分析を行った。その結果、炭素数数十程度の生成物が確認されたが、それよりも長鎖のプレニルニリン酸の生成は確認できなかった。これは、粗酵素溶液調製の段階で長鎖プレニルニリン酸合成活性を有するタンパク質複合体が解離して、目的の活性が消失したためであると考えられる。

パラゴムノキについては、樹液を遠心分離してRubber particle、C-serum、Bottom fractionの3成分に分離した。酵素活性の精製にはBottom fractionを用いることとし、界面活性剤を含む緩衝液に懸濁してタンパク質を可溶化した後、遠心分離して上清を回収して粗酵素抽出液を調製した。この粗酵素抽出液を用いて、アリル性基質と[4-¹⁴C]IPPを反応させ、得られた生成物をTLCで分析を行い、長鎖プレニルニリン酸の生成を確認した。次いで、粗酵素抽出液を陰イオン交換カラムクロマトグラフィーに供し、さらなる精製を試みた。しかし、得られた画分中に長鎖プレニルニリン酸合成活性は検出されなかった。この場合もトチュウの酵素溶液の場合と同様、カラムクロマトグラフィー操作によって酵素複合体が解離したことが原因であると考えられる。

2. パラゴムノキからのイソプレノ鎖伸長反応を触媒する酵素のクローニングおよび特性解析

パラゴムノキが生産するシス型高分子ゴム成分は、アリル性基質と IPP との縮合反応より生じるシス型長鎖プレニルニリン酸（炭素数数千 - 数万）に由来すると考えられている。同様の IPP のシス型縮合反応を触媒し、炭素数 100 程度の生成物を与えるシス型プレニルニリン酸合成酵素がすでにモデル植物であるシロイヌナズナからクローニングされている (Oh, S. K., *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 18482-18488)。この酵素と微生物由来の同様の反応を触媒する酵素数種類の配列情報をもとに縮重プライマーを設計し、パラゴムノキ cDNA ライブラリーを鋳型にして PCR を行い、シス型プレニルニリン酸合成酵素ホモログ遺伝子の部分配列を獲得した。この部分配列をプローブに用いたプライクハイブリダイゼーションによってパラゴムノキ由来シス型プレニルニリン酸合成酵素ホモログ (Hb-cis-PT) をコードする完全長 cDNA を獲得することができた。

獲得したHb-cis-PT遺伝子を大腸菌で発現させ、組換えタンパク質を精製して機能解析することを試みた。始めに、目的遺伝子をpET-22b(+)ベクターに連結して発現用プラスミドpET22-Hb-cis-PTを構築し、これを用いて大腸菌BL21(DE3)株を形質転換し、アフィニティー精製のためのHisタグがC末端に融合し、かつペリプラズムへの輸送シグナルがN末端に付加したHb-cis-PTを発現させ、Hisタグタンパク質用のアフィニティーカラムを用いて部分精製タンパク質試料を調製した。これを用いてアリル性基質と[4-¹⁴C]IPPを反応させ、TLCによって生成物分析を行ったところ、わずかではあるが原点付近に長鎖生成物が検出された。しかしながら再現性のある結果が得られず、また活性を確認するのに十分量の可溶性タンパク質を得ることもできなかった。そこで次に、Hb-cis-PT遺伝子をpET-32b(+)ベクターに連結した発現用プラスミドpET32-Hb-cis-PTを構築し、これを用いて大腸菌BL21(DE3)株の形質転換を行い、HisタグがN末端とC末端の2箇所が付加し、目的タンパク質の可溶性を高めるTrxタグがN末端Hisタグのさらに上流に付加したHb-cis-PTを発現させて、上述と同様にして部分精製し、活性測定と生成物分析を行った。その結果、pET22-Hb-cis-PTを用いて発現させた場合よりも高分子量イソプレノポリマーの生成量の増大がわずかにみられたものの、やはり再現性のある結果は得られなかった。またこの場合も特性解析に十分量の可溶性タンパク質を得る

ことができなかった。

以前よりゴム生合成への関与が示唆されているタンパク質 rubber elongation factor (Hb-REF) をコードする完全長 cDNA を Hb-cis-PT の場合と同様の手法にて獲得した。この Hb-REF 遺伝子を pET-42b(+)ベクターに連結した発現用プラスミド pET42-Hb-REF を構築し、これを用いて大腸菌 BL21(DE3)株の形質転換を行い、アフィニティー精製のための GST タグが N 末端に融合した Hb-REF を発現させ、GST タグタンパク質用のアフィニティーカラムを用いて精製を試みた。目的タンパク質の大部分が封入体を形成したため、不溶性封入体を尿素変性後、段階的透析によってタンパク質の巻き戻しを行い、可溶性の目的タンパク質を獲得した。この GST タグが付加した可溶性の Hb-REF と上述の Hb-cis-PT を用いて IPP の縮合反応の活性測定を行ったが、2 種類のタンパク質の共存によってイソプレンポリマー合成が明確に観察されるということとはなかった。

大腸菌を用いた発現系では目的タンパク質を可溶性で十分量得ることは難しく、*Saccharomyces cerevisiae* あるいは *Pichia pastoris* 等を宿主とした酵母発現系を使用することも検討すべきであったと考えている。また、これらのタンパク質の異種発現はいずれの宿主を用いた場合もやはり困難であることも予想されるので、単離した遺伝子を用いた構築によってトチュウあるいはパラゴムノキ自体を形質転換し、目的遺伝子が大量発現した、あるいは RNAi 等によって発現が抑制されたような形質転換体を作成して、これらのゴム成分を分析することで単離した遺伝子の機能評価が可能であると考えられる。最近、東北大学のグループによって Hb-cis-PT と高い相同性を有するタンパク質が炭素数 100 程度のプレニルニリン酸を合成することが報告された (Asawatreratanakul, K., et al. (2003) *Eur. J. Biochem.* **270**, 4671-4680)。パラゴムノキのゴム成分の前駆体となるプレニルニリン酸はこれよりもはるかに高分子量であると予想されるので、彼らが報告した酵素は高分子量ゴム合成には関与しないか、または高分子量ゴム合成にはこの酵素に加えて他の因子の必要であるのではないかと考えられる。

3. シロイヌナズナからのイソプレン鎖伸長反応を触媒する酵素のクローニングおよび特性解析

モデル植物であるシロイヌナズナは、炭素数 40 - 100 前後のトランス型およびシス型プレニルニリン酸を生産することが知られている。*in vitro* ゴム合成反応系を構築するためのモデル酵素として、これらの化合物を合成する酵素の遺伝子をシロイヌナズナから単離し、機能解析を行った。

シロイヌナズナのゲノムデータベースを検索して、トランス型プレニルニリン酸合成酵素のホモログで、かつ生成物鎖長決定領域が炭素数 30 以上を生成するタイプのものを選別した。これをコードする cDNA を RT-PCR で獲得した。また 5' および 3' 非翻訳領域についても 5' および 3' -RACE にて決定を行った。得られた cDNA のコード領域を pET-15b ベクターに連結して発現用プラスミドを構築し、これを用いて大腸菌 BL21(DE3) 株を形質転換して、アフィニティー精製のための His タグが N 末端に付加した組換えタンパク質を発現させ、His タグタンパク質用のアフィニティーカラムを用いて精製タンパク質試料を調製した。これを用いて各種アリル性基質と [4-¹⁴C] IPP を反応させ、TLC によって生成物分析を行った結果、アリル性基質に炭素数 15 のファルネシルニリン酸 (FPP) と炭素数 20 のゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP) を用いた場合のみに縮合活性が検出され、いずれのアリル性基質を用いた場合も炭素数 45 のソラネシルニリン酸 (SPP) が主生成物として得られ、単離した cDNA が SPP 合成酵素 (At-SPS1) をコードすることが明らかとなった。精製組換えタンパク質を用いて速度論解析を行った結果、At-SPS1 は FPP よりも GGPP に対して低い K_m 値を示し、GGPP に対してより高いアリル性基質特異性を示す傾向があることがわかった。

次に、At-SPS1 のアミノ酸配列をプローブにシロイヌナズナの配列データベースを検索したところ、1 つの相同性の高い配列を見出すことができた。目的配列をコードする cDNA を RT-PCR で獲得し、また 5' および 3' -RACE によって 5' および 3' 非翻訳領域の決定も行った。獲得した cDNA のコード領域を pET-15b ベクターに組み込み、大腸菌 BL21(DE3) 株で His タグが N 末端に付加した組換えタンパク質として発現させ、At-SPS1 の場合と同様にしてアフィニティー精製、酵素活性測定、TLC による生成物分析を行った。その結果、アリル性基質に FPP と GGPP を用いた場合のみに縮合活性が検出さ

れ、いずれのアリル性基質を用いた場合も炭素数 45 のSPPが主生成物として得られ、単離したcDNAがSPP合成酵素 (At-SPS2) をコードすることがわかった。At-SPS1と同様、At-SPS2のN末端部分にも推定シグナル配列が存在し、At-SPS2ではこれを含んだ状態で発現させると酵素の大部分が不溶化したため、推定シグナル配列を除去した酵素 (At-SPS2Δ) を上述と同様の手法にて調製し、これを用いて速度論解析を行った。その結果、At-SPS2ΔはFPPよりもGGPPに対して低い K_m 値を示し、これはAt-SPS1と同様の傾向であった。また、At-SPS2とAt-SPS2Δの基質特異性にも違いは見られなかった。At-SPS1とAt-SPS2の細胞内局在を明らかにするため、各酵素の全配列を緑色蛍光タンパク質のN末端に連結した融合タンパク質発現系を構築し、シロイヌナズナの葉肉細胞プロトプラストで一過性発現を行った。蛍光顕微鏡観察の結果、At-SPS1は粗面小胞体に、At-SPS2は葉緑体に局在することがわかり、At-SPS1はユビキノン側鎖生成に、At-SPS2はプラストキノン側鎖生成に関与すると考えられた。

従来知られていた植物由来トランス型プレニルニリン酸合成酵素の生成物鎖長は炭素数 20 までであり、本研究で特性解析を行った炭素数 45 の生成物を与える酵素は新規酵素であるといえる。また、シロイヌナズナゲノム上のAt-SPS1とAt-SPS2の各遺伝子が存在する領域を解析したところ、ともに推定プロモーター領域に光応答性配列であるG-boxを見出すことができた。今後、ノーザンブロットあるいはReal time PCRによって各遺伝子の転写が光照射によって制御を受けるかについての解析、あるいは下流にレポーター遺伝子を連結したプロモーター解析を行い、これらの遺伝子の発現制御に関する知見が得られれば興味深いと考えている。

シロイヌナズナのシス型プレニルニリン酸合成酵素についての報告はすでにあるが (Oh, S. K., et al. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 18482-18488), *in vitro* ゴム合成反応系を構築するためのモデル酵素として利用するためにこの酵素をコードするcDNAをRT-PCRで単離し、獲得したcDNAのコード領域をpET-15bベクターに組み込み、大腸菌BL21(DE3)株でHisタグがN末端に付加した組換えタンパク質として発現させ、At-SPS1の場合と同様にしてアフィニティー精製、酵素活性測定、TLCによる生成物分析を行った。その結果、炭素数 100 前後のプレニルニリン酸の生成を確認することができた。

パラゴムノキ由来Hb-cis-PTのアミノ酸配列をプローブにシロイヌナズナの配列データベースを検索したところ、1つの相同性の高い配列を見出すことができた。目的配列をコードするcDNAをRT-PCRで獲得し、得られたcDNAのコード領域をpET-15bベクターに組み込み、大腸菌BL21(DE3)株でHisタグがN末端に付加した組換えタンパク質として発現させ、At-SPS1の場合と同様にしてアフィニティー精製、酵素活性測定、TLCによる生成物分析を行った。しかしながら、発現させた組換えタンパク質の大部分が封入体を形成したため十分量の可溶性タンパク質を調製することができず、また少量の部分精製試料を用いて活性測定を行った際もIPPの縮合活性を検出することはできず、このタンパク質の機能解明には至らなかった。

5. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表 (論文掲載済、または査読済を対象。)

Hirooka, K., Bamba, T., Fukusaki, E., and Kobayashi, A. (2003) *Biochem. J.* **370**, 679-686. Cloning and kinetic characterization of *Arabidopsis thaliana* solanesyl diphosphate synthase.

(2) 口頭発表 (発表済を対象。)

2002年3月26日 日本農芸化学会2002年度(平成14年度)大会

広岡和丈、馬場健史、中澤慶久、福崎英一郎、小林昭雄 長鎖イソプレノイドの生合成研究 - シロイヌナズナにおける1,4-ベンゾキノン類側鎖合成酵素の解析 -

2002年7月12日 第12回ドリコールおよびイソプレノイド研究会例会

広岡和丈、馬場健史、福崎英一郎、小林昭雄 シロイヌナズナ由来ソラネシルニリン酸合成酵素のクローニング

2003年4月2日 日本農芸化学会2003年度(平成15年度)大会

泉良和、広岡和丈、福崎英一郎、小林昭雄 シロイヌナズナから単離した新規長鎖ブレニルニリン酸合成酵素の解析

2003年8月5日 30th Annual Meeting Plant Growth Regulation Society of America & Japanese Society for Chemical Regulation of Plants

Hirooka, K., Izumi, Y., Bamba, T., Fukusaki, E., and Kobayashi, A. Cloning and characterization of two solanesyl diphosphate synthases from *Arabidopsis*.

2003年9月4日 第13回ドリコールおよびイソプレノイド研究会例会

広岡和丈、泉良和、安忠一、中澤慶久、福崎英一郎、小林昭雄 シロイヌナズナから単離した2種類のソラネシルニリン酸合成酵素の機能解析

(3)特許等

1件